

· 实验研究 ·

清达颗粒对 AngII 诱导的高血压小鼠肾脏损害的干预研究[※]

● 杨美玲^{1,2} 周雪玲¹ 彭美中¹ 卢妍¹ 彭军^{1,3,4} 陈友琴¹ Thomas Joseph SFERRA^{1,5} 褚剑锋^{1,3,4}▲

摘要 目的:探讨清达颗粒对 Ang II 诱导的高血压肾损伤小鼠血压及相关病理的影响。方法:将 18 只小鼠随机分为 3 组:对照组、模型组及给药组,其中模型组及给药组予 Ang II 通过植入式胶囊渗透压泵连续灌注 28d 以建立高血压模型。给药组予清达颗粒灌胃给药,剂量为 22.9mg/天/0.2ml,对照组和模型组予等体积的生理盐水灌胃,每天 1 次,连续给药 28d。结果:与模型组对比,清达颗粒能够抑制血压的升高幅度,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,清达颗粒能够明显改善肾小动脉及肾小球硬化,降低肾小球内胶原阳性比例($P < 0.05$)。结论:清达颗粒能降低 Ang II 诱导的高血压小鼠的血压、减轻肾脏损伤。

关键词 清达颗粒;高血压;肾脏损伤;Ang II

高血压是引起肾脏损害和终末期肾病的重要危险因素,其中过度激活的肾素血管紧张素系统是引起高血压及高血压肾脏损伤的重要发病机制之一^[1]。现有的药物治疗措施还不能完全逆转高血压肾损害至终末期肾衰的进程,大量的基础与临床研究证实,中医药对高血压肾损害的治疗表现出了一定的潜力,但其相应作用机制尚不清楚。清达颗粒是陈可冀院士由其几十年的临床经验方清眩降压汤化裁而来的,主要药物组成有天麻、钩藤、黄芩、莲子心,具有清肝热、平肝阳等功效,主治高血压病。本文采用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱发的高血压小鼠为研究对象,观察在高血压肾损害进程中清达颗粒对血

压、肾脏病理形态的影响,探讨该方对高血压肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 18 只, SPF 级,体重 20 ~ 25g,由上海斯莱克实验动物公司提供(实验动物许可证号:2018093),在福建中医药大学实验动物中心饲养。

1.2 主要实验试剂与仪器 Ang II (Sigma, RN474 - 91 - 3, A9525 - 10mg); 植入式胶囊渗透压泵 (ALZET); 小鼠无创血压测量系统(肯特动物无创血压测量系统, kent); 糖原 PAS 染色液试剂盒 (Abcam); Masson 三色染色试剂盒 (Abcam); 清达颗粒(由天江药业有限公司制备,批号 1805351); HE 染色液(索莱宝, G1120)。

1.3 动物模型构建 雄性 C57BL/6 小鼠 18 只适应环境一周后常规饲养,用 5% 水合氯醛(7ml/kg)麻醉,依据体重编号,并由此采用数字表法,随机分为 3 组:(1) 对照组(n=6):剔除肩胛背部的鼠毛,作一假切口并缝合,作为对照;(2) 模型组(n=6):植入灌有 Ang II 胶囊渗透压泵,该泵可连续 28d 释放 Ang II 到周围组织(500ng/kg/min),最后将其缝合。(3) 给药组(n=6):植入 Ang II 渗透压泵并灌胃给药治疗 28d。

※基金项目 国家自然科学基金(No. 81774135);福建省自然科学基金(No. 2018J01884);福建省卫计委医学创新人才项目(No. 2018 - CX - 42)

▲通讯作者 褚剑锋,男,医学博士,副教授,硕士研究生导师。主要从事心血管疾病的基础与临床研究。E-mail: jianfengchu@126.com

• 作者单位 1. 福建中医药大学(福建 福州 350122); 2. 福建中医药大学附属第三人民医院(福建 福州 350122); 3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福建 福州 350122); 4. 福建中医药大学陈可冀学术思想传承工作室(福建 福州 350122); 5. 凯斯西储大学医学院(美国 克利夫兰 44106)

给药组于手术后第一天开始予清达颗粒(生理盐水溶解,制作母液备用)灌胃给药,根据人一日一剂换算,鼠每次剂量为 22.9mg/天/0.2mL,模型组和对照组灌以同等体积的生理盐水,每天 1 次,连续给药 28d。

1.4 血压测量 分别测量手术前、手术第 1、3、5、7、14、21 天及手术第 28 天的收缩压和舒张压。

1.5 肾脏病理检测 新鲜小鼠肾脏组织去除包膜后,沿横截面将肾脏切开,取 1/2 肾脏组织经 4% 多聚甲醛固定 24H 后,包埋、制作石蜡切片。采用 HE、PAS、Masson 染色观察肾脏损伤、胶原沉积及炎症细胞在肾脏的浸润情况。HE、PAS 和 Masson 法的染色程序参照试剂盒说明书。

1.6 肾小球硬化程度评分^[2] 每张切片观察取 6 个视野,评分肾小球损伤程度。分为 0 分:正常肾小球、无硬化;1 分:轻度损伤,肾小球损伤比例 < 25%; 2 分:中度损伤,肾小球损伤比例 25% ~ 75%; 4 分:完全损伤,肾小球损伤比例 > 75%。纤维化测量方法:

每张切片取 6 个视野,采用 IPP 软件计算蓝色纤维化面积占总面积的百分比。

1.7 统计学方法 采用 SPSS18.0 软件对数据进行统计分析,计量资料若符合正态分布,以均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,若不符合则以中位数和四分位数间距(M, Q)表示,采用非参数分析(秩和检验等)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 清达颗粒对血压的影响 给药前,三组的血压差异无统计学意义(P > 0.05);给药后,模型组的血压从第 1 天开始就逐渐升高,与对照组相比具有统计学差异;给药组的血压(收缩压从第 7 天开始到第 28 天、舒张压从第 21 天到第 28 天)与模型组相比具有统计学差异(P < 0.05),清达颗粒干预显著抑制了血压的升高幅度。见表 1、表 2。

表 1 清达颗粒连续给药后各组小鼠不同时间点收缩压变化 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 天	1 天	3 天	5 天	7 天	14 天	21 天	28 天
对照组	6	120.5 ± 3.1	119.7 ± 4.7	125.3 ± 6.7	121.3 ± 7.5	122.5 ± 5.6	122.3 ± 6.0	120.8 ± 10.2	119.5 ± 7.0
模型组	6	124.3 ± 1.9	150.0 ± 3.4*	160.8 ± 6.7*	165.2 ± 7.6*	172.8 ± 5.8*	172.0 ± 5.6*	172.8 ± 2.9*	175.3 ± 3.3*
给药组	6	124.8 ± 2.8	124.3 ± 2.8	151.7 ± 8.7	158.5 ± 3.5	161.3 ± 3.4 [△]	160.5 ± 5.6 [△]	156.3 ± 5.6 [△]	156.5 ± 7.0 [△]

注:与对照组比较,*P < 0.05;与模型组比较,[△]P < 0.05

表 2 清达颗粒连续给药后各组小鼠不同时间点舒张压变化 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 天	1 天	3 天	5 天	7 天	14 天	21 天	28 天
对照组	6	80.7 ± 8.0	74.5 ± 8.1	83.3 ± 14.9	77.5 ± 5.5	77.7 ± 5.9	77.3 ± 7.0	76.5 ± 3.1	78.7 ± 3.8
模型组	6	86.3 ± 6.2	105.8 ± 4.6*	111.3 ± 8.8*	115.5 ± 11.0*	125.8 ± 8.7*	122.3 ± 11.6*	124.5 ± 3.7*	128.0 ± 5.2*
给药组	6	76.2 ± 5.3	104.7 ± 5.0	108.8 ± 11.3	115.0 ± 2.4	118.5 ± 4.6	115.7 ± 6.3	112.3 ± 6.4 [△]	113.7 ± 1.4 [△]

注:与对照组比较,*P < 0.05;与模型组比较,[△]P < 0.05

2.2 清达颗粒对小鼠肾脏病理特征和硬化积分的影响 如图 1 所示,对照组可见肾小球形态正常无固缩,肾小囊未增大,肾小囊壁未见增厚,近、远曲小管结构正常,未见蛋白管型;模型组可见大多数肾小球严重固缩,灌注不足,肾小囊增大,球囊粘连,肾小囊壁增厚(→所示);而清达颗粒组肾小球结构形态相比模型组大有改善,肾小球固缩减轻,肾小囊减小。

进一步评估肾小球硬化程度,采用积分评估,如图 2 所示,与对照组对比,模型组肾小球硬化积分显著增高(P < 0.05),清达颗粒给药后肾小球硬化积分较模型组显著降低(P < 0.05)。PAS 染色显示(图 3),模型组肾小球固缩,基底膜增厚、肾小管萎缩、肾小囊增宽(→所示),清达颗粒干预显著改善上述病理特征。

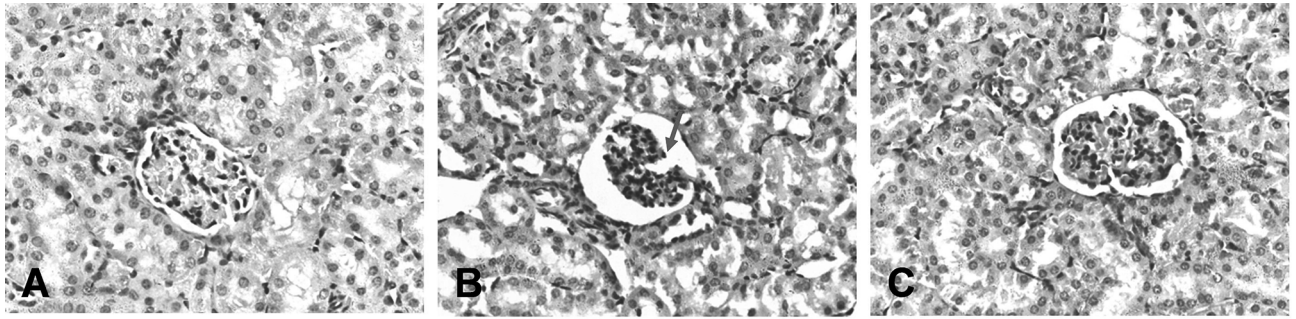


图 1 清达颗粒对 Ang II 引起的肾脏损害的一般病理影响(HE 染色, ×400)

注:A:对照组;B:模型组;C:给药组

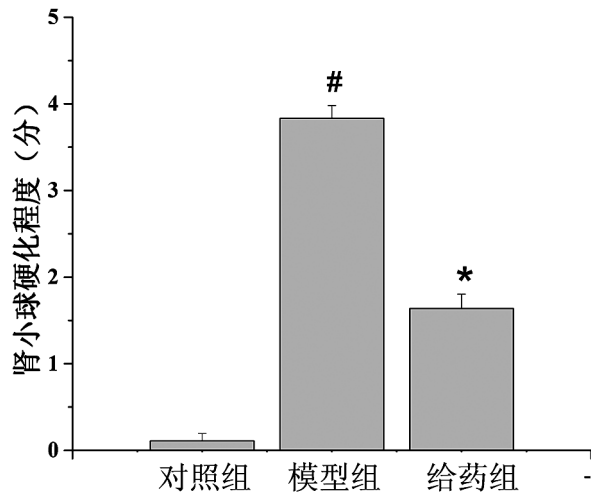


图 2 清达颗粒对各组肾小球硬化程度积分的影响

注:模型组 VS 对照组, [#] $P < 0.05$; 给药组 VS 模型组, ^{*} $P < 0.05$

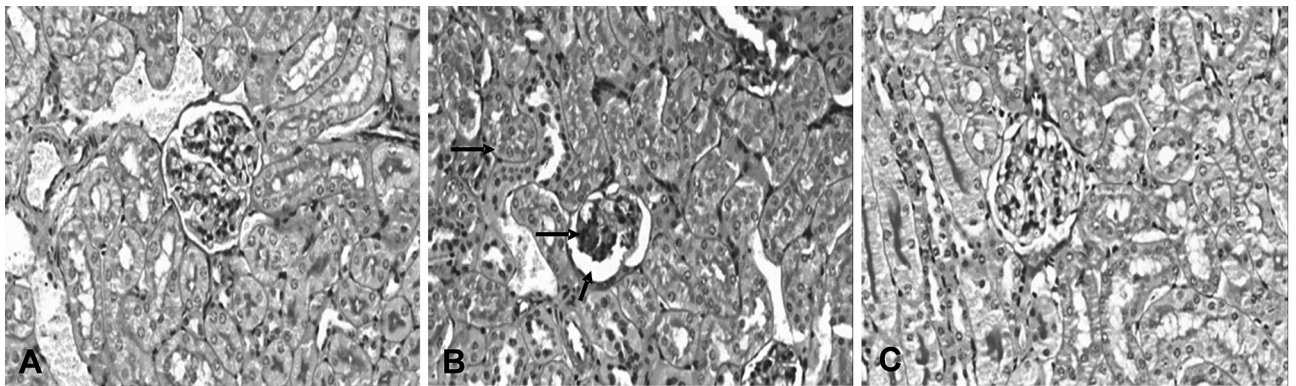


图 3 清达颗粒对 Ang II 引起的肾小球基底膜的影响(PAS 染色, ×400)

注:A:对照组;B:模型组;C:给药组

2.3 清达颗粒对肾脏纤维化的影响 如图 4 所示,与对照组对比模型组肾小球和肾间质蓝染明显(→所示),清达颗粒干预后,蓝染的胶原纤维明显减少。如图 5 所示,与对照组比较,模型组肾小囊及肾间质胶

原阳性表达明显($P < 0.05$),给药组肾小囊及肾间质纤维性物质较模型组明显减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

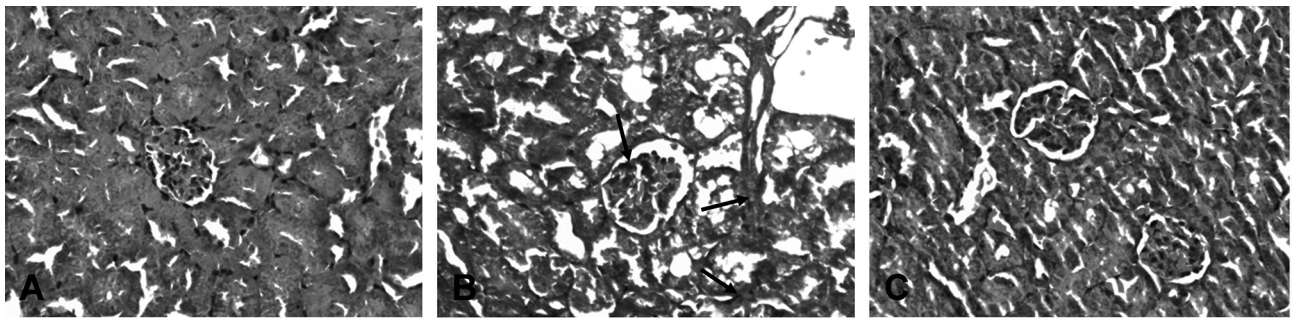


图 4 清达颗粒对 Ang II 引起的肾脏纤维化的影响 (Masson 染色, ×400)

注:A:对照组,B:模型组,C:给药组

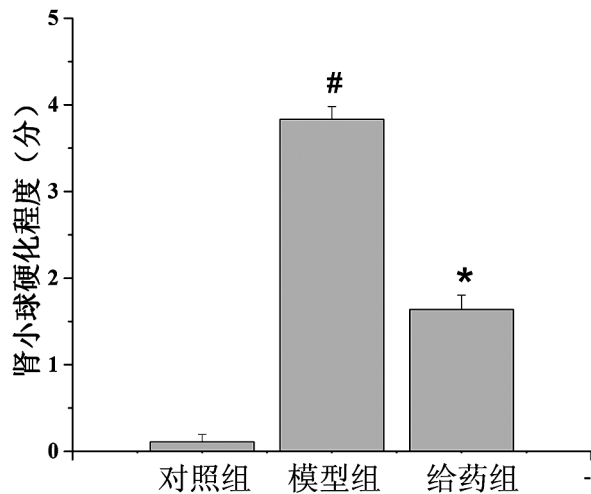


图 5 清达颗粒对各组肾脏胶原阳性区域比率的影响

注:模型组 VS 对照组, [#] $P < 0.05$; 给药组 VS 模型组, ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

高血压是最常见的慢性疾病之一,在《中国高血压防治指南 2018 修订版》中,将高血压的诊断标准定为:在未使用降压药物的情况下,诊室收缩压 $\geq 140\text{mm Hg}$ 和(或)舒张压 $\geq 90\text{mm Hg}$;根据血压水平分为正常、正常高值血压和 1、2、3 级高血压;同时,还根据血压水平、心血管危险因素、靶器官损害、临床并发症和糖尿病进行心血管危险分层,分为低危、中危、高危和很高危 4 个层次。3 级高血压伴 1 项及 1 项以上危险因素,合并靶器官损害、CKD3 期以上、糖尿病等均属于心血管风险很高危患者^[3]。可见,高血压具有高发病率及致死率,可累及多处靶器官。其中,肾脏损伤是高血压很常见的并发症之一。美国最新肾脏疾病统计数据显示,高血压是导致终末期肾病的第 2 位病因^[4-5]。

Ang II 是血管紧张素中最重要的组成部分,具有收缩血管、促进醛固酮分泌、参与渴觉反应、影响心输出量、增加血管通透性等生理功能。其中收缩血管和

促进醛固酮分泌是最为重要的^[6]。研究证明,Ang II 通过作用于球状带上的 AI 受体(受体存在于细胞膜上),二者结合以后诱导生成一种酶蛋白,后者便以某种方式促使胆固醇转变成孕烯醇酮,然后孕烯醇酮再经多次转变,最后生成醛固酮。当醛固酮分泌过多时将引起钠水滞留进而血压升高^[7]。因此,Ang II 不仅能影响小动脉的紧张度,而且还能影响血容量,这两种因素的相互作用,在很大程度上,决定了血压的高低。肾脏器官的细胞上存在有血管紧张素受体,有研究表明,高血压肾损害的发病机制与交感神经系统(SNS)活性升高、肾素-血管紧张素系统异常、盐负荷、遗传或先天因素、高血压状态下肾小球前小动脉阻力增加及肾小球内高压有关^[4]。

清达颗粒是陈可冀院士由其 60 余年临床经验方清眩降压汤^[8]化裁而来,主要用于治疗高血压病患者。其中天麻、钩藤平肝潜阳熄风,辅以莲子心、黄芩清热滋阴,共奏平肝阳、清肝热之功。本研究发现该方可以降低 Ang II 诱导的高血压小鼠的收缩压、舒张压。与模型组对比,该方较好地抑制了由高血压导致

的肾小球硬化固缩、肾小管增生、蛋白管型形成,改善肾脏纤维化等。其机制可能与抑制循环肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性,控制血压的升高有关。

中药组方的整体调节特征与辨证观念是从多靶点、多层次的整体较为综合的层面发挥药理学作用,从而达到防病治病的目的。清达颗粒可能是通过有效中药成分调控 RAAS 的平衡,以此发挥降压作用,改善临床症状,促进肾损害等病理改变的恢复,不仅起到了降低血压的作用,还从整体上保护靶器官的损害。综上所述,清达颗粒能够抑制 Ang II 诱导的血压升高幅度,减轻由于高血压导致的肾损害。本次研究没有对药物剂量梯度进行评价,是否增加剂量能够进一步提高疗效,相关药效机制是什么,与交感神经系统活化、整个 RAAS 有关与否,是否与血管内皮功能保护有关等等,一系列的问题都值得进一步研究与探索。今后相关研究工作也将沿着上述问题,以及规范的临床疗效评价来开展,也期望能够获得令人满意的结果。

参考文献

- [1] 韩琳,秦建国,高誉珊,等. 降压通路方对高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II 及肾功能的影响[J]. 环球中医药,2015,8(1):36-41.
- [2] 黄蕾,刘彦彬,林宇涵,等. 去除巨噬细胞对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠肾脏的保护作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2017,26(3):240-245.
- [3] 《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南 2018 年修订版[J]. 心脑血管病防治,2019,19(1):1-45.
- [4] Foley RN, Collins AJ. The USRDS: what you need to know about what it can and can't tell us about ESRD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013, 8(5):845-851.
- [5] 何红梅,梅爱敏,田河林,等. 泽泻汤加味方对高盐诱导大鼠高血压肾功能损害的保护作用[J]. 山东医药,2017,57(17):31-33.
- [6] 张庆文,魏立业,戚国庆,等. 血管紧张素 II 拮抗剂与心房重构的研究进展[J]. 疑难病杂志,2007,6(9):567-568.
- [7] 冯建全. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统与高血压[J]. 青岛医学院学报,1978(21):96-111.
- [8] 褚剑锋,吴广文,郑国华,等. 清眩降压汤对自发性高血压模型大鼠肾脏的保护作用[J]. 中医杂志,2012,53(5):420-423.

(收稿日期:2019-03-08)

(本文编辑:蒋艺芬)

(上接第 72 页)

- [13] 陈平,邓万溪,王海洲,等. 小针刀结合滚足法治疗跖筋膜炎症性跟痛症 25 例[J]. 浙江中医杂志,2016,51(8):605-606.
- [14] 戴朝富. 针刀配合隔姜灸治疗背肌筋膜炎症 117 例[J]. 上海针灸杂志,2011,30(12):857.
- [15] 陈红燕,杨米雄,陈彩仙. 三联疗法治疗腰臀肌筋膜炎症[J]. 中医正骨,2010,22(11):56-58.
- [16] 叶晓品,陈龙安,付俊,等. 小针刀结合点刺放血治疗小腿肌筋膜炎症的临床观察[J]. 浙江中医药大学学报,2012,36(3):280-282.
- [17] 瞿群威,路红根. 封闭配合针刀治疗腰背肌筋膜炎症 92 例临床观察[J]. 湖北中医杂志,2005,27(3):47-48.
- [18] 王春龙. 中药穴位贴敷结合小针刀治疗肩背肌筋膜炎症 80 例的临床疗效观察[D]. 黑龙江:黑龙江中医药大学,2015.
- [19] 钟泳坚. “扳机点”小针刀配合手法治疗腰背部肌筋膜疼痛综合征临床观察[J]. 新中医,2013,45(10):105-107.
- [20] 姜仁建,蒲萍. 小针刀结合拔罐治疗腰背肌筋膜炎症临床观察[J]. 中国中医急症,2017,26(10):1873-1874.
- [21] 丁晓医. 小针刀联合小关节复位治疗腰背肌筋膜炎症 50 例[J]. 中医研究,2016,29(8):73-75.
- [22] 陈号,刘龙彪,沈斌,等. 小针刀配合扶正固本穴位埋线法治疗肌筋膜炎症的临床观察[J]. 中医药临床杂志,2018,30(4):704-706.
- [23] 廖宗力. 激痛点针刀松解合 TDP 照射治疗颈项部肌筋膜炎症的疗效研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [24] 王蓉,林佳,刘小琼. 热敏灸结合毫刃针治疗腰背肌筋膜炎症临床观察[J]. 实用中医药杂志,2017,33(8):964-965.
- [25] 张义,权伍成,尹萍,等. 针刀疗法的适应证和优势病种分析[J]. 中国针灸,2010,30(6):525-528.
- [26] 张学真,王杰. 针刀疗法在临床被广泛推广的原因探究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2018,6(12):23-24.

(收稿日期:2018-07-18)

(本文编辑:金冠羽)